

신세포암에서 Tissue Microarray를 이용하여 분석한 Caveolin-1 발현과 예후와의 연관성

Correlation of Caveolin-1 Expression on Tissue Microarray with Prognosis in Renal Cell Carcinoma

Yong Yeun Won, Hee Jae Joo¹, Dae Sung Cho, Kyung Sik Seo, Byung Cheol Ahn, Ki Hoon Kim, Se Joong Kim

From the Departments of Urology and ¹Pathology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Purpose: We investigated the relationship between the expression of caveolin-1, using a tissue microarray (TMA), and the prognosis of patients with renal cell carcinoma (RCC).

Materials and Methods: TMA sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of RCC from 82 patients, who had undergone radical nephrectomy, were stained immunohistochemically with specific antibodies against caveolin-1. The caveolin-1 immunostaining was semi-quantitatively estimated based on intensity. The expression pattern of caveolin-1 was compared with the clinicopathological variables.

Results: The expression of caveolin-1 was significantly correlated with tumor size ($p=0.002$), TNM stage ($p<0.001$), T stage ($p=0.001$), M stage ($p=0.004$), grade ($p=0.028$) and metastasis ($p<0.001$), and was also significantly higher in clear cell than non-clear cell RCC ($p<0.001$). The survival of patients with higher caveolin-1 expression was significantly worse than that of patients with lower caveolin-1 expression ($p=0.001$). Univariate analyses were able to identify all variables, including caveolin-1 expression as significant prognostic factors for cancer-specific survival; multivariate analyses indicated that TNM stage, M stage and grade were independent prognostic factors. Caveolin-1 expression was not an independent factor.

Conclusions: The increased expression of caveolin-1 is associated with tumor size, stage, grade, metastasis and a worse prognosis in RCC, which suggests that caveolin-1 may be important in the progression of RCC. (Korean J Urol 2006;47:607-613)

Key Words: Caveolin-1, Tissue microarray, Prognosis, Renal cell carcinoma

대한비뇨기과학회지
제 47 권 제 6 호 2006

아주대학교 의과대학
비뇨기과학교실, ¹병리학교실

원용연 · 주희재¹ · 조대성 · 서경식
안병철 · 김기훈 · 김세중

접수일자 : 2006년 2월 3일
채택일자 : 2006년 2월 27일

교신저자: 김세중
아주대학교병원 비뇨기과
경기도 수원시 영통구 원천동
산 5번지
☎ 443-721
TEL: 031-219-5272
FAX: 031-219-5276
E-mail: sejoong@ajou.ac.kr

서 론

Tissue microarray (TMA) 기법은 1998년 Kononen 등¹이 처음 소개한 이래, 수십에서 수백 개의 서로 다른 조직들을 하나의 슬라이드에서 작업하여 판독하므로 기존의 전통적인 방법에 비하여 시간 및 비용의 절감과 판독의 표준화를 이룰 수 있다는 장점이 있어,^{1,3} 여러 종양들에서 진단, 치료 및 예후에 대한 종양표지자 연구에 이용되고 있다.^{2,6}

소포 (caveolae)는 세포질막 (plasma membrane)의 소포성

(vesicular) 함입구조로서 분자수송, 세포유착 및 신호전달 (signal transduction)에 관여하는데, caveolin-1은 소포의 중요한 구조단백질이다.⁷⁻⁹ Caveolin-1은 Src family tyrosine kinase, epidermal growth factor receptor, Neu/HER2 (c-erbB2), protein kinase C, transforming growth factor- β /SMAD, Wnt/beta-catenin/lef-1 경로들과 같은 여러 신호전달경로에 관여한다.⁹⁻¹¹

다양한 caveolin-1의 이상 발현은 당뇨병, 알츠하이머병, 근위축 (muscular dystrophy) 등 여러 질환뿐만 아니라 각종 악성 종양과도 관련이 있다.¹⁰ 그러나 caveolin-1의 이상 발

현은 종양마다 양상이 달라 그 역할에 대해서는 아직 논란의 여지가 있다. 난소암,¹² 폐암,¹³ 췌장의 선관 내 유두상-점소양 암 (intraductal papillary-mucinous tumors),¹⁴ 육종¹⁵ 등에서는 caveolin-1의 발현이 저하되어 있어 종양억제유전자로 추정하고 있다. 반면에 대장암,¹⁶ 식도암,¹¹ 췌관 선암 (pancreatic ductal adenocarcinoma),¹⁷ 유방암,¹⁸ 전립선암,¹⁸ 방광암¹⁹ 등에서는 caveolin-1이 과발현되어 있고, 이러한 과발현이 종양의 크기, 병기, 분화도 및 예후 등과 관련이 있어 악성 전환 (malignant transformation)에 관여하는 것으로 생각한다.

최근에 신세포암에서도 caveolin-1 발현에 관한 일부 보고들이 있다. 그중에는 caveolin-1의 과발현이 불량한 예후와 연관된다는 보고들²⁰⁻²²이 있는 반면, 신세포암에서 caveolin-1의 발현이 양성 종양인 호산성과립세포종 (oncocytoma)과 정상 신조직에 비해 감소되어 있어 caveolin-1의 하향조절 (down-regulation)이 악성 증식의 경로에 중요한 역할을 하리라는 보고²³도 있어, 신세포암에서 caveolin-1의 역할에 대해서는 아직 논란의 여지가 있다.

이에 저자들은 신세포암에서 TMA 기법을 이용하여 caveolin-1의 발현을 확인하고, caveolin-1의 발현과 여러 임상 병리학적 변수들과의 연관성을 확인하여 봄으로써 예후와의 연관성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상환자 및 신세포암 조직

1995년 1월부터 2001년 9월까지 본원에서 신세포암으로 근치적 신적출술을 시행받은 환자 중 추적관찰이 가능하였던 82명을 대상으로 하였다. 이들 환자 중 술 전에 신세포암

에 대한 다른 치료를 받은 환자는 없었다. 환자들의 평균 연령은 55.6세 (27-82)였고, 남자 63명, 여자 19명이었으며, 종양의 위치는 우측이 50례, 좌측이 32례였다. 병리조직아형별로는 투명신세포암 72례 (87.8%), 유두상 신세포암 6례 (7.3%), 혈색소신세포암 4례 (4.9%)가 있었다.

신세포암의 병기는 1997년 AJCC (American Joint Committee on Cancer) 및 UICC (Union Internationale Contre le Cancer)의 TNM 분류법,²⁴ 분화도는 Fuhrman's nuclear grade 분류법²⁵에 따라 분류하였다.

2. TMA 및 면역조직화학염색

TMA는 AccuMaxTM array (이수 애플리스사, 대한민국)를 이용하여 파라핀에 포매된 조직 블록으로부터 1mm 직경의 원통형 조직 (core)을 3-4mm 길이로 떼어내어 두께 5-10mm의 새로운 파라핀 블록에 이식하여 제작하였다. 이식되는 조직의 간격은 0.5mm를 유지하고 한 개의 슬라이드에 100개 정도의 조직 절편을 준비하였다 (Fig. 1). 각 환자의 조직에서 4군데의 서로 다른 원통형 조직을 얻어 제작하였다.

새로 파라핀에 포매된 조직 블록을 10% neutral buffered formalin (NBF)으로 고정하고 4 μ m 절편으로 만들어서 슬라이드에 부착한 후, 파라핀을 제거하고 재수화시켰다. Citrate buffer (pH 6.0)에 넣어서 microwave로 15분간 처리하고 3% H₂O₂를 첨가한 methanol로 10분간 실온에서 처리한 후, Cap-PlusTM Detection Kit (ZYMED, San Francisco, USA)에 들어 있는 blocking reagent로 10분간 처리하였다. 일차항체로는 1:200으로 희석된 caveolin-1에 대한 단일클론항체 (clone 2297; BD Biosciences, San Diego, USA)로 처리하고, 습윤상자를 이용하여 37°C에서 1시간 동안 보관하였다. Cap-PlusTM

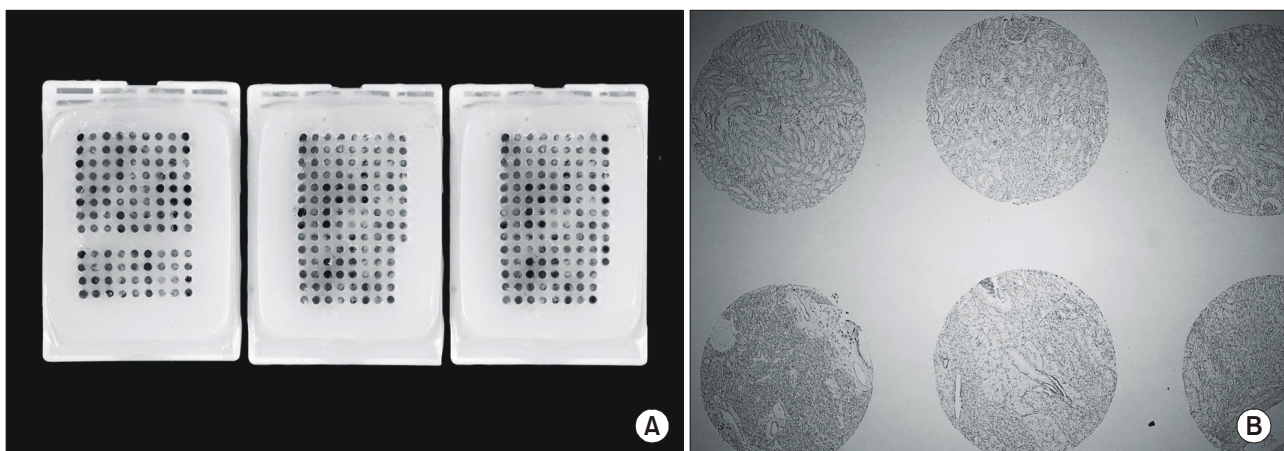


Fig. 1. Tissue microarray (TMA) slide of renal cell carcinoma tissues. (A) TMA paraffin block of renal cell carcinoma. (B) Immunohistochemically stained TMA slide (x40).

Detection Kit에 들어있는 이차항체 (biotinylated secondary antibody)와 streptavidin-HRP로 실온에서 처리한 후, substrate-chromogen인 diaminobenzidine (DAB)을 사용하여 발색하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 하고 봉입제로 봉입하여 광학현미경하에서 판독하였다.

양성대조표본은 caveolin-1 발현이 많은 것으로 알려져 있는 평활근세포와 내피세포의 표본 내에서의 염색으로 이용하였고, 음성대조표본은 일차항체를 처리하지 않은 것으로 하였다.

3. Caveolin-1 발현의 분석

Caveolin-1 발현의 분석은 1명의 병리의사에 의해 시행되었다. Caveolin-1의 발현은 세포질과 세포막 중 어느 부위에나 염색되면 발현된 것으로 판정하였다. 발현정도의 분석을 위해서는 염색강도 (intensity)에 따라 반정량적으로 점수화하였다. 염색강도는 염색이 전혀 되지 않는 경우를 0, 평활근세포와 같은 정도로 염색된 경우를 2로 정하고, 0과 2 사이 정도의 염색강도를 1, 2보다 염색강도가 강할 때를 3으로 하여 총 4단계로 분류하였고 (Fig. 2), 4개의 조직 중에 가장 강하게 염색된 경우를 선택하였다.

4. 통계학적 분석

Caveolin-1 발현과 여러 임상병리학적 변수들과의 연관성에 관한 분석은 independent-sample t-test 혹은 one-way ANOVA test를 이용하였다. 생존율은 Kaplan-Meier법을 이용하였다. 단변량 분석은 log-rank test로 검증하였고, 다변량 분석은 Cox proportional hazards regression model을 이용하였다.

각각의 통계학적 분석은 p값이 0.05 미만인 경우에 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

본 연구에 이용한 신세포암 환자 82명의 임상병리학적 특성은 Table 1에 요약하였다. 59명에서는 근치적 신적출술 후 평균 49.6개월, 중앙값 43개월 (19-96)의 추적관찰 기간 동안 완전관해 상태를 유지하였다. 23명에서는 원격전이가 확인되었는데, 그중 10명에서는 근치적 신적출술 시행 당시에 이미 전이가 있었고, 13명에서는 근치적 신적출술 후 평균 22.4개월, 중앙값 21개월 (4-56)에 전이가 발생하였다. 추적관찰 도중에 14명이 사망하였는데, 근치적 신적출술 시행 당시에 전이가 있었던 10명 중에는 8명이, 추적관찰 중에 전이가 발생한 13명 중에는 6명이 사망하였다. 전이가 발생한 총 23명 중 16명에서는 전이병소에서 병리조직학적으로 전이를 확인하였다.

Caveolin-1 발현 (염색강도)은 신세포암 환자 82례 중 16례 (19.5%)에서는 전혀 발현이 되지 않았고 (염색강도 0), 28례 (34.1%)에서는 약하게 발현되었으며 (염색강도 1), 27례 (32.9%)에서는 중등도로 발현되었고 (염색강도 2), 11례 (13.5%)에서는 강하게 발현되었다 (염색강도 3).

림프절 전이는 단지 3례에서만 확인되었기 때문에, 림프절 전이에 따른 분석은 시행하지 않았다.

Caveolin-1의 과발현은 종양의 크기 ($p=0.002$), TNM 병기 ($p<0.001$), T 병기 ($p=0.001$), M 병기 ($p=0.004$), 분화도 ($p=0.028$) 및 전이 ($p<0.001$)와 통계학적으로 유의한 연관성을 보였다. 병리조직아형에 따라서는 투명신세포암이 비투명

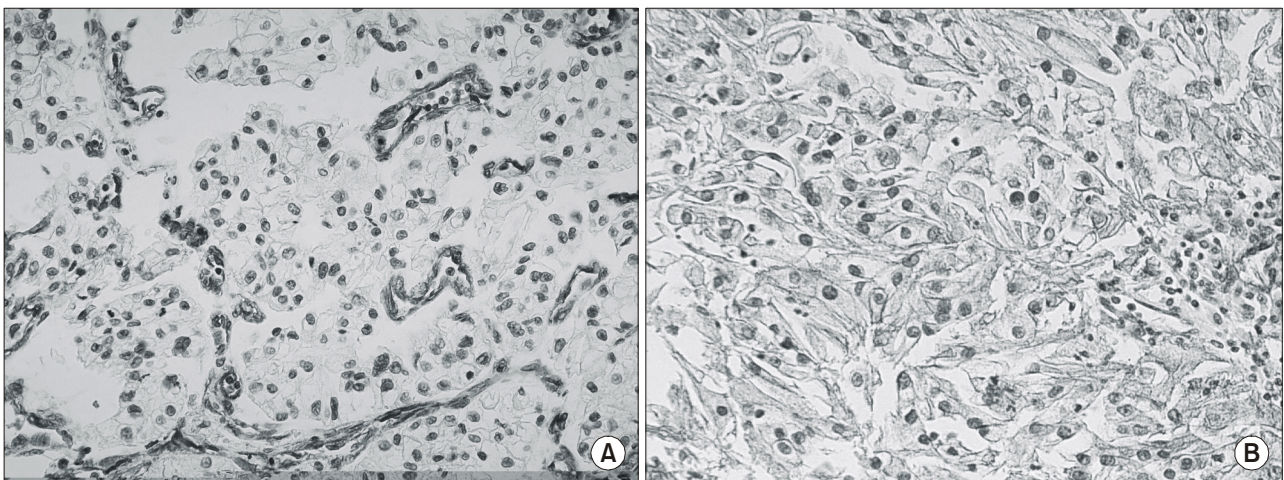


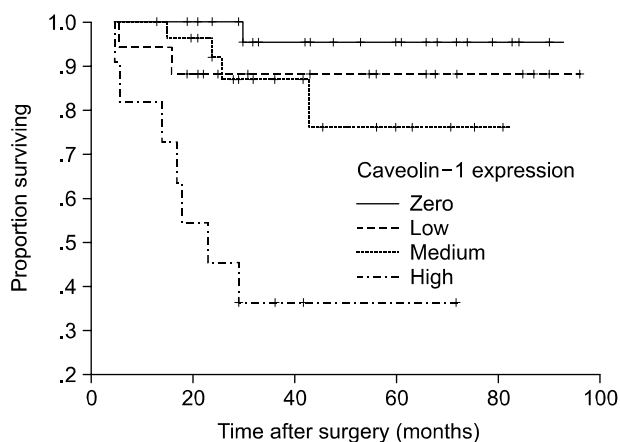
Fig. 2. Immunohistochemical staining for caveolin-1 in renal cell carcinoma tissues (x400). (A) Endothelial cells are stained as an internal control, but cancer cells are not stained (caveolin-1 intensity 0). (B) Cancer cells are strongly stained for caveolin-1 (intensity 3).

Table 1. Clinicopathological data of 82 patients with renal cell carcinoma

Characteristics	No. of patients (%)
Pathologic type	
Clear cell	72 (87.8)
Non-clear cell	10 (12.2)
TNM stage	
I	39 (47.6)
II	11 (13.4)
III	21 (25.6)
IV	11 (13.4)
T stage	
T1	42 (51.2)
T2	11 (13.4)
T3	27 (32.9)
T4	2 (2.4)
N stage	
N0	79 (96.3)
N1	3 (3.7)
M stage	
M0	72 (87.8)
M1	10 (12.2)
Grade	
1	7 (8.5)
2	16 (19.5)
3	52 (63.4)
4	7 (8.5)
Metastasis	
No	59 (72.0)
Yes	23 (28.0)

Table 2. Relationship between the expression of caveolin-1 and the clinicopathological variables in 82 patients with renal cell carcinoma

Variables	No. of patients	Caveolin-1 expression	p-value
Pathology			
Clear cell	72	1.56±0.90	<0.001
Non-clear cell	10	0.20±0.42	
Tumor size			
≤7cm	55	1.16±0.83	0.002
>7cm	27	1.85±1.06	
TNM stage			
I	39	0.97±0.78	<0.001
II	11	1.18±1.08	
III	21	1.86±0.85	
IV	11	2.18±0.87	
T stage			
T1	42	1.07±0.84	0.001
T2	11	1.18±1.07	
T3	27	1.89±0.89	
T4	2	2.50±0.71	
M stage			
M0	72	1.28±0.92	0.004
M1	10	2.20±0.92	
Grade			
G1	7	0.86±0.89	0.028
G2	16	1.19±0.91	
G3	52	1.40±0.91	
G4	7	2.29±1.11	
Metastasis			
No	59	1.12±0.83	<0.001
Yes	23	2.09±0.95	

**Fig. 3.** Kaplan-Meier cancer-specific survival curves according to the expression of caveolin-1. The survival of patients with higher caveolin-1 expression is significantly worse than that of patients with lower caveolin-1 expression ($p=0.001$).

신세포암에 비해 caveolin-1이 유의하게 과발현되었다 ($p < 0.001$) (Table 2).

Kaplan-Meier 생존곡선에서 caveolin-1 발현이 높은 환자는 caveolin-1 발현이 낮은 환자에 비해 유의한 생존율의 감소를 보였다 ($p=0.001$) (Fig. 3). 암특이생존율에 영향을 미치는 인자들을 확인하기 위하여 단변량 및 다변량 분석을 시행하여 본 결과 단변량 분석에서는 종양의 크기, TNM 병기, T 병기, M 병기, 분화도 및 caveolin-1 발현이 통계학적으로 유의한 예후인자였다.

다변량 분석에서는 TNM 병기 ($p < 0.001$), M 병기 ($p < 0.001$) 및 분화도 ($p=0.040$)만이 독립적인 예후인자로서 통계학적인 의미가 있었고, caveolin-1 발현은 독립적인 예후인자는 아니었다 (Table 3).

Table 3. Univariate and multivariate survival analysis of 82 patients with renal cell carcinoma

Variables	Univariate	Multivariate	
	p-value	Hazards ratio	p-value
Tumor size	0.009	1.116	0.909
TNM stage	<0.001	59.209	<0.001
T stage	0.004	0.330	0.355
M stage	<0.001	83.298	<0.001
Grade	0.012	8.806	0.040
Caveolin-1	0.001	2.146	0.328

고 찰

TMA 방법의 주된 장점은 기존의 전통적인 병리 슬라이드 방법과는 달리 서로 다른 많은 조직들을 하나의 슬라이드에서 작업하여 관독할 수 있다는 것이다. 따라서 대량으로 같은 슬라이드를 제작하여 여러 종양표지자들을 동시에 연구할 수 있으므로 시간 및 비용의 절감을 이룰 수 있고, 관독의 표준화가 용이하므로 조직의 분석도 정확할 수 있다.^{1,3}

반면에 TMA는 그 방법으로 인한 한계점이 있을 수 있다. 가장 중요한 잠재적 한계점은 조직의 크기 (tissue volume)인데, 분석에 사용되는 조직의 크기가 0.6-1mm이므로 특히 이질성 (heterogeneity)이 강한 종양일수록 전체 조직을 반영하지 못할 가능성이 있으나 여러 연구들에서 조직의 크기는 결과에 영향을 미치지 않는다고 하였다.²⁶⁻²⁸ 그리고 Pacifico 등²⁹은 원통형 조직의 수에 따른 TMA와 전통적 기법 사이의 일치율을 비교하여 본 결과 원통형 조직 1개를 사용한 경우에는 56.7%, 2개를 사용한 경우에는 70%, 3개를 사용한 경우에는 90%, 4개를 사용한 경우에는 96.6%의 일치율을 보여, 각 조직에서 서로 다른 4곳의 원통형 조직을 사용할 것을 제안하였다. 또한 TMA에서 2곳의 원통형 조직으로 충분히 전체 조직을 대변할 수 있다는 보고들도 있다.^{2,26}

본 연구에서는 각 환자의 조직에서 서로 다른 4곳의 원통형 조직을 얻어 가장 강하게 염색된 조직을 caveolin-1 발현의 분석에 이용하였는데, 82명의 신세포암 조직 중 9.8%에서만 4개 조직 사이에 염색의 차이를 보여 기존의 전통적 방법을 충분히 대체할 수 있다고 생각한다.

Caveolin-1은 세포질막에 존재하며, 세포 내 신호전달 경로의 조절에 관여하는 것으로 알려진 소포의 중요한 구조 단백질이다.^{7,9} Caveolin-1의 이상 발현은 악성 종양을 포함

하여 여러 중요한 질병들의 발생과 연관이 있는 것으로 생각된다.¹⁰ 그러나 일부 악성 종양에서는 caveolin-1의 발현이 저하되어 있어 종양억제유전자로 추정하고 있는¹²⁻¹⁵ 반면에 또 다른 악성 종양에서는 caveolin-1이 과발현되어 있고 이러한 과발현이 악성 전환에 관여하는 것으로 보고되어 있어,^{11,16-19} 악성 종양에서 caveolin-1의 역할에 대해서는 아직 명확하지 않다.

최근에 신세포암에서도 caveolin-1 발현에 관한 일부 보고들이 있다. Carrion 등²³은 신종양에서 caveolin-1의 발현 양상을 확인하여 본 결과 caveolin-1 발현이 신세포암에서 양성 종양인 호산성파립세포종과 정상 신조직에 비해 감소되어 있어 caveolin-1의 하향조절이 악성 증식의 경로에 중요한 역할을 하리라고 하였다. 또한 caveolin-1 발현은 신세포암의 병리조직아형에 따라서는 별 차이가 없었고, 호산성파립세포종과 신세포암의 감별진단에 도움이 되겠다고 하였다.

반면에 caveolin-1의 과발현이 불량한 예후와 연관된다는 보고들도 있다. Joo 등²⁰은 67명의 투명신세포암 환자들을 대상으로 caveolin-1의 발현 양상을 확인하여 본 결과 caveolin-1 발현이 암특이생존율에 대한 독립적인 예후인자는 아니지만 전이 및 불량한 예후와 연관이 있어 투명신세포암의 진행에 중요한 역할을 하리라고 하였다. Campbell 등²¹도 114명의 국소 신세포암 환자들을 대상으로 한 연구에서 caveolin-1 발현이 높을수록 무병생존율이 낮았고, caveolin-1의 과발현은 불량한 무병생존율에 대한 독립적인 예후인자로서 종양의 진행에 관여하리라고 하였다. Horiguchi 등²²도 60명의 신세포암 환자들을 대상으로 한 연구에서 caveolin-1의 과발현은 분화도, 림프절 전이 및 정맥침윤 여부와 연관이 있었고, 비전이성 신세포암 환자들 중에는 caveolin-1 발현 양성인 경우가 caveolin-1 발현 음성인 경우에 비해 무진행생존율이 유의하게 낮으므로, caveolin-1은 신세포암에서 침윤 및 전이로 진행되는데 중요한 역할을 하리라고 하였다.

따라서 신세포암에서 caveolin-1의 역할에 대해서는 아직 논란의 여지가 있는데, 본 연구의 결과는 신세포암에서 caveolin-1의 과발현이 불량한 예후와 연관됨을 뒷받침해 준다. 본 연구 결과 caveolin-1의 과발현은 종양의 크기, TNM 병기, T 병기, M 병기, 분화도 및 전이와 유의한 연관성을 보였고, caveolin-1 발현이 높은 환자는 caveolin-1 발현이 낮은 환자에 비해 유의한 생존율의 감소를 보였다. 따라서 caveolin-1 발현이 다변량 분석에서 암특이생존율에 대한 독립적인 예후인자는 아니었지만 신세포암에서 전이 및 생존율과 연관이 있으므로 신세포암의 진행에 관여하리라고 생각한다.

결론

신세포암에서 TMA 기법을 이용하여 caveolin-1의 발현을 확인하여 본 결과 caveolin-1의 과발현은 종양의 크기, 병기, 분화도, 전이 및 불량한 예후와 연관이 있었다. 따라서 caveolin-1은 신세포암의 진행에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 생각한다.

REFERENCES

- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844-7
- Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *Bio-techniques* 2004;36:98-105
- Horvath L, Henshall S. The application of tissue microarrays to cancer research. *Pathology* 2001;33:125-9
- Zellweger T, Ninck C, Mirlacher M, Ansfeld M, Glass AG, Gasser TC, et al. Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer. *Prostate* 2003;55:20-9
- Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Stüss K, Wagner U, Forster T, et al. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol* 2001;194:349-57
- Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, et al. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 1999;154:981-6
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992;68:673-82
- Anderson RG. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10909-13
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1998;273:5419-22
- Engelman JA, Zhang X, Galbiati F, Volonte D, Sotgia F, Pestell RG, et al. Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer disease, and muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1998;63:1578-87
- Kato K, Hida Y, Miyamoto M, Hashida H, Shinohara T, Itoh T, et al. Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Cancer* 2002;94:929-33
- Wiechen K, Diatchenko L, AgoulNIK A, Scharff KM, Schober H, Arlt K, et al. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2001;159:1635-43
- Wikman H, Kettunen E, Seppänen JK, Karjalainen A, Hollmen J, Anttila S, et al. Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array. *Oncogene* 2002;21:5804-13
- Terris B, Blaveri E, Crnogorac-Jurcevic T, Jones M, Missiaglia E, Ruszniewski P, et al. Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Am J Pathol* 2002;160:1745-54
- Wiechen K, Sers C, AgoulNIK A, Arlt K, Dietel M, Schlag PM, et al. Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas. *Am J Pathol* 2001;158:833-9
- Fine SW, Lisanti MP, Galbiati F, Li M. Elevated expression of caveolin-1 in adenocarcinoma of the colon. *Am J Clin Pathol* 2001;115:719-24
- Suzuoki M, Miyamoto M, Kato K, Hiraoka K, Oshikiri T, Nakakubo Y, et al. Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002;87:1140-4
- Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, et al. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:1873-80
- Sanchez-Carbajo M, Socci ND, Charytonowicz E, Lu M, Prystowsky M, Childs G, et al. Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes. *Cancer Res* 2002;62:6973-80
- Joo HJ, Oh DK, Kim YS, Lee KB, Kim SJ. Increased expression of caveolin-1 and microvessel density correlates with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int* 2004;93:291-6
- Campbell L, Gumbleton M, Griffiths DF. Caveolin-1 overexpression predicts poor disease-free survival of patients with clinically confined renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003;89:1909-13
- Horiguchi A, Asano T, Asakuma J, Asano T, Sumitomo M, Hayakawa M. Impact of caveolin-1 expression on clinicopathological parameters in renal cell carcinoma. *J Urol* 2004;172:718-22
- Carrion R, Morgan BE, Tannenbaum M, Salup R, Morgan MB. Caveolin expression in adult renal tumors. *Urol Oncol* 2003;21:191-6
- Guinan P, Sobin LH, Algaba F, Badellino F, Kameyama S, MacLennan G, et al. TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997;80:992-3
- Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982;6:655-63
- Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. Tissue microarray: a new technology for amplification of

- tissue resources. *Cancer J* 2001;7:24-31
27. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest* 2001;81:1331-8
28. Merseburger AS, Kuczyk MA, Serth J, Bokemeyer C, Young DY, Sun L, et al. Limitations of tissue microarrays in the evaluation of focal alterations of bcl-2 and p53 in whole mount derived prostate tissues. *Oncol Rep* 2003;10:223-8
29. Pacifico MD, Grover R, Richman P, Daley F, Wilson GD. Validation of tissue microarray for the immunohistochemical profiling of melanoma. *Melanoma Res* 2004;14:39-42
-